پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۱۰ شمارهٔ۱، نیمهٔ اوّل ۱۳۹۸، صفحهٔ ۲۷-۱۲
نوع مقاله: پژوهشی

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 10, No. 1, 2019, p. 12-27 (Research Article)
DOI: 10.22067/ijpr.v10i1.57457

مطالعه ارتباط بین الگوی پروتئین دانه با صفات کمّی در برخی ارقام زراعی نخود (*Cicer arietinum* L.)

مهدی کاکایی*
استادیار گروه مهندسی کشاورزی (اصلاح‌نباتات و ژنتیک)، دانشگاه پیام‌نور

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۱۷

چکیده

از جمله روش‌های مطالعه وجود تنوع‌ژنتیکی میان گونه‌های گیاهی، استفاده از روش الکتروفورز پروتئین‌های بذر می‌باشد. استفاده از نشانگرهای پروتئینی در جداسازی ارقام نخود به‌عنوان یک منبع ارزشمند غذایی مهم است. الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای چهار رقم نخود (آرمان، هاشم، ILC-482 و آزاد) با روش SDS-PAGE بررسی شد. برای این منظور از ژل ۱۲/۵درصد پلی‌اکریل‌آمید استفاده گردید. نتایج الکتروفورز نشان داد که تفاوت الگوی پروتئینی ارقام مورد مطالعه بیشتر مربوط به باندهای پروتئینی موقعیت ۱۷ و ۲۵کیلودالتون است. بر اساس نتایج SDS-PAGE، به‌طور میانگین ۲۸/۷۵باند پروتئینی، در محدود ۱۴ تا ۱۰۰کیلودالتون شناسایی گردید. حضور باندهای پروتئینی با وزن تقریبی ۱۷کیلودالتون در الگوی پروتئینی ارقام ILC-482، هاشم و آزاد می‌تواند به‌عنوان نشانگرهای پروتئینی برای این ارقام و باند پروتئینی ۱۴کیلودالتون برای رقم آرمان معرفی شوند. دو رقم ILC-482 و آرمان و نیز هاشم، به‌ترتیب بیشترین و کمترین تعداد باند را داشتند و بیشترین فاصله ژنتیکی بین ارقام ILC-482 و آرمان مشاهده شد. ماتریس تشابه محاسبه و تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد به روش UPGMA انجام گردید. در رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو دامنه ضرایب تشابه از ۰/۷۸ تا ۰/۸۷ متغیر بود. جهت تعیین همبستگی بین صفات زراعی و مولکولی از آزمون مانتل-هانزل (Mantel-Hansel) استفاده شد و همبستگی بین صفات زراعی در شرایط تنش خشکی و شرایط آبیاری تکمیلی با داده‌های مولکولی مشاهده گردید ($P\leq 5\%$). با بررسی شاخص‌های تنش خشکی و نتایج حاصل از بای‌پلات رقم آرمان به‌عنوان متحمل‌ترین رقم شناخته شد و در هر دو شرایط محیطی تنش خشکی و بدون تنش عملکرد بالاتری نسبت به سایر ارقام از خود بروز داد. همچنین تجزیه بای‌پلات نشان داد که شاخص‌های YI و HAM بهترین شاخص‌های تحمل به خشکی بودند.

واژه‌های کلیدی: آبیاری تکمیلی، آزمون مانتل، بای‌پلات، شناساگر پروتئینی، ضریب جاکارد

مقدمه

نخود زراعی (*Cicer arientinum* L.) از تیره لگومینوزه، گیاهی خودگشن و یکساله است. در بین حبوبات نخود از لحاظ سطح زیرکشت و تولید، پس از لوبیا و عدس در رتبه سوم قرار دارد (Shobeiri *et al*., 2007). بر اساس آخرین آمارنامه (سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳) در ایران نخود با سطح زیرکشت ۷۱۲۰۰۰ هکتار و تولید ۵۱۹ هزار تن، بخش وسیعی از کشت حبوبات را به خود اختصاص داده است (Iran's Agricultural Statistics, 2017). با توجه به مطالعات انجام‌شده، اثرات سوء حاصل از کمبود پروتئین و ویتامین‌های خاص را می‌توان به کمک حبوبات از جمله نخود تأمین کرد. نخود با دارابودن ۱۲/۴ تا ۲۸/۱درصد پروتئین خام، ۵۰ تا۶۰درصد انواع کربوهیدرات‌ها و تقریباً ۶درصد روغن و مقدار قابل‌توجهی فسفر، آهن، کلسیم و ویتامین‌های مختلف، به‌عنوان جزء مهم غذایی در بین کشورهای توسعه‌یافته که به کیفیت رژیم غذایی خود اهمیت می‌دهند، مطرح است (Gupta & Agrawal, 1977). نخود را به مانند عدس، «گوشت فقرا» نامیده‌اند، چراکه تا حدودی می‌تواند جای خالی گوشت حیوانی را در یک برنامه غذایی سالم پُر کند. به‌کارگیری نشانگرهای پروتئینی با کمک روش SDS-PAGE جهت شناسایی واریته‌ها، گونه‌ها و ارقام زراعی در گیاهان مختلف توسط محققان مورد توجه قرار گرفته است. پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه پیش از این نیز برای مطالعه در برخی از گیاهان زراعی مهم نظیر بذر پسته (Ehsanpor*et al*., 2009)، بذر برنج (Abozaryghazafroodi *et al*., 2006)، برگ کلزا تحت شرایط تنش خشکی و نرمال (Kakaei

*__نویسنده مسئول:__ همدان، اسدآباد، دانشگاه پیام‌نور مرکز اسدآباد، گروه کشاورزی دانشگاه پیام‌نور مرکز اسدآباد، تلفن: ۰۸۱۳۳۱۱۷۱۳۱، صندوق پستی: ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵
mehdikakaei37@gmail.com

(*et al*., 2012)، بـرگ کلـزا تحـت تـنش رژیـم‌هـای سـرمایی (Beyranvand *et al*., 2006)، برگ و بذر یونجـه (Fareghi *et al*., 2007)، بذر نخود (Iqbal *et al*., 2005; Hameed *et al*., 2009)، بذر گونه‌های کلـزا (Sadia *et al*., 2009) و بـذر باقلا (Abd El-Zaher & Mustafa, 2007) استفاده شده‌انـد. روابط فیلوژنتیکی در میان گونه‌های *Cicer* بر اساس داده‌هـای حاصـل از الکتروفـورز بـا روش SDS-PAGE توسـط *et al*., Slinkard (1992)، انجـام شـده و *Cicer reticulantum* را نیای وحشی ارقام نخود معرفی نمودند. این گـزارش‌هـا کـارآیی نشانگر پروتئینی را در ارزیابی تنوع‌ژنتیکی بـین جمعیـت‌هـای گیاهی تأییده نموده و نشان داده که نشانگر پروتئینی بـه‌دلیـل عدم تأثیرپـذیری از شـرایط محیطـی اطلاعـات تاکسـونومیکی مفیدی را فراهم می‌نمایـد (SalehiShanjani *et al*., 2013). تکنیک SDS-PAGE، روشی ارزان، سـاده و دقیـق اسـت کـه جهت آنالیز ساختار ژنتیکی ژرم‌پلاسم مورد اسـتفاده قـرار مـی گیرد. پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی به چهار علت بررسی می‌شـوند: ۱- آنـالیز فاصـله ژنتیکـی درون و برون‌گونه‌ای، ۲- اهلی‌کردن گیاهان، اصلاح و حفاظـت از منـابع ژنتیکی، ۳- قرابت ژنتیکی و ۴) به‌عنوان وسیله‌ای برای توسـعه محصولات (Ghafoor *et al*., 2002). پروتئین‌هـای ذخیـره‌ای دانه تا حدود زیادی مستقل از نوسانات محیطی هستند و بـرای مطالعه تنوع‌های ژنتیکی، مطلـوب‌تـر از پـروتئین‌هـای رویشـی هسـتند (Gepts, 1989; Razavizadeh & Ehsanpour, 2013). در مطالعــات طبقــه‌بنــدی از الگوهــای الکتروفــورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای استفاده مـی‌شـود. هـر یـک از بانـدهای ایجادشده در ژل الکتروفورز به‌عنوان صفتی مجزا مـورد بررسـی قرار می‌گیرند (Raeesilelri *et al*., 2015). در تحقیقـی روی برنج، Abozaryghazafroodi *et al*, (2006) ارقام برنج را بـا استفاده از داده‌های الکتروفورزی SDS-PAGE پـروتئین‌هـای ذخیره‌ای دانه و داده‌های صفات کمی گروه‌بنـدی کـرده و ابـراز داشتند که گروه‌بندی بر اساس باندهای پروتئینی مانند تجزیـه خوشه‌ای بر مبنای صفات زراعی تا حدود زیادی قادر به تفکیک ارقام بومی از سایر ارقـام بـود و همچنـین داده‌هـای حاصـل از الکتروفـورز بــه میــزان زیـادی توانــایی تکمیــل داده‌هــای مورفولوژیکی را داشته و می‌توانند مکمل هم باشـند. بـر اسـاس نظر Fernandez (1992)، ژنوتیپ‌ها بر اسـاس پاسـخ عملکـرد آن‌ها به شرایط تنش می‌توانند به چهار گروه طبقه‌بندی شـوند: ۱) ژنوتیپ‌هایی که عملکرد بـالایی در شـرایط تـنش و هـم در شرایط بدون تنش داشته باشد (گروه A)، ۲) ژنوتیپ‌هـایی کـه عملکرد بالایی را تنها در شرایط بدون تنش دارند (گـروهB)، ۳) ژنوتیپ‌هایی که عملکـرد بـالایی را تنهـا در شـرایط تـنش دارا هستند (گروه C) و ۴) ژنوتیپ‌هایی که عملکـرد پـایینی را هـم در شرایط تنش و هم بدون تـنش دارنـد (گـروه D). همچنـین Fernandez (1992) ابراز کرد که بهترین معیار انتخـاب بـرای تنش، معیـاری اسـت کـه بتوانـد گـروه A را از سـایر گـروه‌هـا تشخیص دهد. وی در مطالعه راه‌هـای شناسـایی ژنوتیـپ‌هـای گروهA، شاخص‌های تحمل بـه تـنش STI و GMP را معرفـی کرد. بالابودن مقادیر شاخص‌های GMP و STI برای یک رقـم، نشان از تحمل بالا نسبت به خشکی و عملکرد بـالقوه بـالای آن رقم داشته و می‌تواند ژنوتیـپ‌هـای گـروه A را از ژنوتیـپ‌هـای گـروه‌هـای B و C شناسـایی و تفکیـک نمایـد (Fernandez, 1992). شــاخص دیگــر مــورد اســتفاده، شــاخص میــانگین هارمونیک است. هرچقدر این شاخص بزرگ‌تر باشد، مطلوب‌تـر خواهد بود (Mohammadi, *et al*., 2005). شاخص حساسیت بـه تـنش (SSI) توسـط Fischer & Maurer (1978) ارائـه گردید که هرچقدر مقـدار ایـن شـاخص کمتـر باشـد، نشـان از تحمل بیشتر ارقـام دارد. شـاخص متوسـط بهـره‌وری (MP) را Rosielle & Hamblin (1981) معرفـی نمـود کـه متوسـط تولید یک رقم را در دو محیط تنش و بـدون تـنش نشـان مـی دهد. هرچه مقدار عددی این شاخص بـزرگ‌تـر باشـد، ژنوتیـپ مورد بررسی متحمل‌تر خواهد بـود (Rosielle & Hamblin, 1981). شاخص تحمل به تنش (STI) به‌دلیل این‌کـه ژنوتیـپ هایی را گزینش می‌کند کـه عملکـرد بـالایی در هـر دو محـیط تنش و بدون تنش دارند، معیار مناسبی برای گزینش ژنوتیـپ-های مقاوم به خشکی معرفی شده اسـت. در خصـوص شـاخص تحمل (TOL) بایستی بیان کرد کـه مقـادیر بـالای آن بیـانگر حساسیت بیشتر به خشکی بوده و مقادیر پـایین ایـن شـاخص برای ما مطلوب است. با توجه به تغییرات بارندگی در سال‌هـا و مناطق مختلف، انتخاب گیاهان متحمل به خشکی حیاتی است. Valizadeh *et al*, (2011) در مطالعـه ارتبـاط صـفات مهـم اقتصادی با پروتئین‌های ذخیـره‌ای در لوبیـا ابـراز نمودنـد کـه بررسی ارتباط صـفات کمّـی بـا نوارهـای پروتئینـی و مقایسـه میانگین دو گروه واجد و فاقد این نوارهـا بـا تجزیـه واریـانس و آماره چندمتغیره T^2 هتلینگ نشان داده که بین وجـود و عـدم وجود نوارهای پروتئینی در برخی صفات از جمله وزن۱۰۰دانه، تعداد دانه در نیام و سایر ویژگی‌های دانه و نیام اختلاف معنی-دار وجـود دارد. بـا توجـه بـه اهمیـت اقتصـادی شناسـایی و تشخیص ارقام مختلـف نخـود، هـدف از ایـن مطالعـه، بررسـی الگوی بیان پروتئین‌هـای ذخیـره‌ای دانـه چهـار رقـم (آرمـان، هاشم، ILC-482 و آزاد) به منظور معرفـی بانـدهای پروتئینـی به‌عنوان نشانگر برای شناسایی و تفکیک این ارقام از یکـدیگر و کشت آن عمدتاً به صورت دیـم بـا روش SDS-PAGE اسـت.

همچنین بر اساس فراگیری شرایط کم‌آبی در کشور و بـا توجـه به اهمیت نخـود در بـین حبوبـات در ایـران و ناحیـه تحقیـق، مطالعه صفات زراعی مهم و در نتیجـه شناسـایی مناسـب‌تـرین رقم بر اساس شاخص تحمل به خشکی در ارقام مذکور و ارتباط بین صفات کمی و الگوی باند پروتئینی ارقـام، از جملـه اهـداف دیگر مطالعه حاضر بودند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از چهار رقم نخود زراعی با نام‌هـای هاشـم، آرمــان، ILC-482 و آزاد، تهیــه شــده از معاونــت مؤسســه تحقیقـات دیـم در سـرارود کرمانشـاه جهـت مطالعـه الگـوی پروتئین‌های بذر و شناسایی رقم متحمل به خشکی در منطقـه تحقیق (مزرعه آموزشـی-تحقیقـاتی دانشـگاه پیـام نـور مرکـز اسدآباد) استفاده شد. به منظور استخراج پروتئین‌های کل بـذر، ابتــدا بــذرها در هــاون چینــی بــه خــوبی کوبیــده شــد و سپس۲۰میلی‌گرم از پودر به‌دست‌آمده از بذر هر رقم با ۲میلـی لیتر بافر اسـتخراج (تـریس۵۰میلـی‌مـولار بـا pH=8.5 حـاوی ۱EDTA،میلی‌مولار PMSF، ۱ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۰میلـی مــــــــولار، ۰/۲درصـــــــــدNP-40 و ۲درصـــــــــد 2-Mercaptoethanol) مخلوط گردید. به مخلوط حاصل پس از دو ساعت نگهداری در یخچال به مقدار دو میلی‌لیتـر اسـتون سرد حاوی۱۰درصـد TCA[۱] اضـافه شـده و پـس از دو سـاعت نگهداری در فریزر به مدت ۱۵دقیقه در ۱۳۰۰۰g× سـانتریفیوژ گردید. از پودر نسبتاً سـفید بـه‌دسـت‌آمـده، جهـت الکتروفـورز استفاده شد {(Jinghui*et al.*, 2006) با بعضی تغییرات}.

آماده‌سازی ژل الکتروفـورز: در ایـن مطالعـه از تکنیـک SDS-PAGE (الکتروفورز با ژل پلی‌اکریل‌آمید با حضور سدیم دو دسیل سولفات) {(Laemmli, 1970) بـا کمـی تغییـرات} اسـتفاده گردیـد. مقـدار پـروتئین نیـز بـا اسـتفاده از روش Bradford (1976) ارزیابی شد. ژل‌های جداکننده (ژل پایین) و متـراکم‌کننـده (ژل بـالا) بـه ترتیـب بـا غلظـت‌هـای ۱۲/۵ و ۵درصـد، بهتـرین نسـبت‌هـا بـرای تفکیـک مناسـب بانـدهای پروتئینـی تشـخیص داده شـد. از پروتئینـی کـه دارای غلظـت ۵میلــی‌گــرم در میلــی‌لیتــر بــود، ۱۰میکرولیتــر از پــروتئین استخراجی جهـت الکتروفـورز بـا سـرنگ هـامیلتون در داخـل چاهک‌ها قرار گرفت. الکتروفورز با شدت جریـان۵۰ولـت بـرای حرکت پروتئین‌ها در ژل بـالا (۰/۵سـاعت) و جریـان۱۵۰ولـت برای حرکت پروتئین‌ها در ژل جداکننده (۱/۵ساعت) تا رسیدن رنـگ نشـانگر بـه انتهـای ژل ادامـه یافـت. بعـد از الکتروفـورز، رنگ‌آمیزی به مدت دو ساعت با کوماسی‌بلـو بریلیانـت R-250 انجام و سپس ژل با محلول رنگ‌بـری تیمـار شـده و در نهایـت ژل‌هــا اســکن شــدند. از پــروتئین‌هــای اوترانســفرین (۷۸کیلودالتون)، آلبـومین گـاوی (۶۶کیلودالتـون)، اوآلبـومین (۴۵کیلودالتـــون)، اکتینیـــدین (۲۹کیلودالتـــون)، بتـــا-لاکتوگلوبـولین (۱۸کیلودالتـون) و لیـزوزیم (۱۴کیلودالتـون) به‌عنوان مارکر در ژل استفاده گردید. به منظور تجزیه و تحلیـل آماری باندهای پروتئینی، ابتدا تعـداد بانـدها مشـخص گردیـد. وزن مولکولی پروتئین‌های مورد مطالعه با تعیین مقادیر حرکت نسـبی (Rf[۲]) بـرای بانـدهای پروتئینـی و مقایسـه بـا نمـودار استاندارد وزن مولکولی تعیین گردید.

خصوصیات طرح آزمایشی و عملیات زراعی

به منظور تعیـین مناسـب‌تـرین شـاخص‌هـای تحمـل بـه خشکی در چهار رقم نخود، آزمایش در سال زراعـی ۸۹-۱۳۸۸ در قالب طرح بلوک‌های کامـل تصـادفی در سـه تکـرار و در دو بخـش، تـنش خشـکی و شـرایط آبیـاری تکمیلـی، در مزرعـه آزمایشی و آزمایشگاه گروه کشـاورزی دانشـگاه پیـام‌نـور مرکـز اسدآباد اجرا گردید. هر کرت شامل ۵خط کاشت به طول ۲متـر با فواصل خطوط۴۰سانتی‌متر و فواصل بین بوته در روی ردیف، ۶سانتی‌متر بودند. عملیات تهیه زمین شـامل شـخم، دیسـک و ایجاد فارو بود. کاشت به‌صورت دستی در اواخر اسفندماه صورت پذیرفت. آبیاری در بخـش شـرایط آبیـاری تکمیلـی در مرحلـه پایان گـل‌دهـی صـورت گرفـت، در حـالی‌کـه در بخـش تـنش خشکی، در مرحله انتهای گل‌دهی آبیاری صورت نگرفت. مبارزه با علف‌های هرز به صورت دستی و در مرحله قبـل از گـل‌دهـی صورت پذیرفت. برای انجام یادداشت‌برداری‌ها از هر ژنوتیـپ در هر تکرار ۵بوته به تصادف انتخاب گردید. برای محاسـبه صـفت عملکرد دانه، یک مترمربع از هر کرت برداشـت گردیـد. جهـت اندازه‌گیری طول و عرض نیام، تعـداد هشـت نیـام بـه تصـادف انتخاب و برای اندازه‌گیری صفت تعداد بوتـه در مترمربـع، یـک مترمربع از هر کرت درنظرگرفته شد. برداشت نهایی هـر کـرت، موقعی صورت گرفت کـه بـیش از۹۰درصـد نیـام‌هـا رنـگ زرد متمایل به قهوه‌ای به خود گرفته بودند و بـر مبنـای حـذف اثـر حاشیه‌ای در هر کدام از آزمایشات آبی و دیم انجام گردید.

---

۱ Tricolor acetic acid

۲ Relative factor

تاریخ نیام‌دهی

این صفت فنولوژی نیز با توجه به بازدیدهای مزرعه‌ای و بر اساس ۵۰درصد نیام‌دهی بوته‌ها محاسبه گردید.در هرکرت هشت بوته به‌صورت تصادفی انتخاب و تعداد نیام در آن‌ها شمارش گردید و میانگین آن‌ها محاسبه شد. برای تعداد شاخه های فرعی هشت بوته به‌صورت تصادفی انتخاب و میانگین آن‌ها محاسبه شد. ارتفاع از سطح زمین تا آخرین قسمت برگ انتهایی برای هشت بوته مورد نظر در هر کرت اندازه‌گیری گردید. طول دوره پُرشدن دانه نیز با شمارش روز از مدت زمان تشکیل نیام تا زمان رسیدگی محاسبه گردید.

محاسبه شاخص‌های تحمل به خشکی

به منظور بررسی ارقام از نظر واکنش به تنش خشکی، پس از تعیین عملکرد دانه در هر دو شرایط محیطی (تنش خشکی و آبیاری تکمیلی) اقدام به محاسبه شاخص‌های تحمل به خشکی به شرح زیر گردید (Fischer & Maurer, 1978; Rosielle & Hamblin, 1981; Bouslama & Fernandez Schapaugh, 1984; Hossein *et al*., 1990 & 1992).

۱-شاخص تحمل TOL=YP-YS (TOL[1])

۲-شاخص حساسیت به تنش (SSI[2])

SSI=1-(YS/YP)/SI

$SI=1-\overline{YS}/\overline{YP}$

در این فرمول، SI[3] شدت تنش می‌باشد.

۳-میانگین هارمونیک

HAM=2(YP*YS)/(YP+YS)(HAM[4])

۴-شاخص عملکرد (YI[5]) $YI= YS/\overline{YS}$

۵- شاخص میانگین هندسی بهره‌وری

GMP=(YS*YP)1/2(GMP[6])

۶- شاخص پایداری عملکرد (YSI[7]) YSI=(YS/YP)

۷- شاخص تحمل به تنش (STI[8]) STI=(YP*YS)/YP

۸-میانگین حسابی عملکرد (MP[9]) MP=(YS+YP)/2

YP: عملکرد هر ژنوتیپ در محیط بدون تنش، YS: عملکرد هر ژنوتیپ در محیط تنش، YS: میانگین عملکرد کلیه ژنوتیپ‌ها در محیط تنش، YP: میانگین عملکرد کلیه ژنوتیپ ها در محیط بدون تنش، SI: شدت تنش.

تجزیه خوشه‌ای و آنالیز آماری

جهت مطالعه و آنالیزهای آماری چندمتغیره نظیر تجزیه خوشه‌ای در هر نمونه بر اساس وجود باند (کد۱) یا فقدان باند (کد۰)، هر باند پروتئینی کددهی شده و باندهای پروتئینی به‌عنوان صفات کیفی درنظرگرفته شدند. از مطالعات عینی به منظور تعیین موقعیت هر باند پروتئینی در SDS-PAGE استفاده شد. جهت تعیین میزان شباهت میان گونه‌های بررسی شده از ضریب تشابه جاکارد[10] استفاده گردید. بر اساس حضور و غیاب باندها و با تحلیل خوشه‌ای UPGMA (Sneath & Sokal, 1973) و استفاده از ضریب روابط خویشاوندی ارقام نخود با استفاده از نرم‌افزار NTSYS, SPc2 ارزیابی گردید و با کمک آزمون مانتل همبستگی بین صفات کمی و داده‌های کیفی (حاصل از الگوی باند پروتئینی) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت رسم منحنی بای‌پلات و اشکال سه‌بعدی از نرم‌افزار SPSS Ver. 16 و محاسبه شاخص‌ها از نرم‌افزار MSTAT-C استفاده گردید.

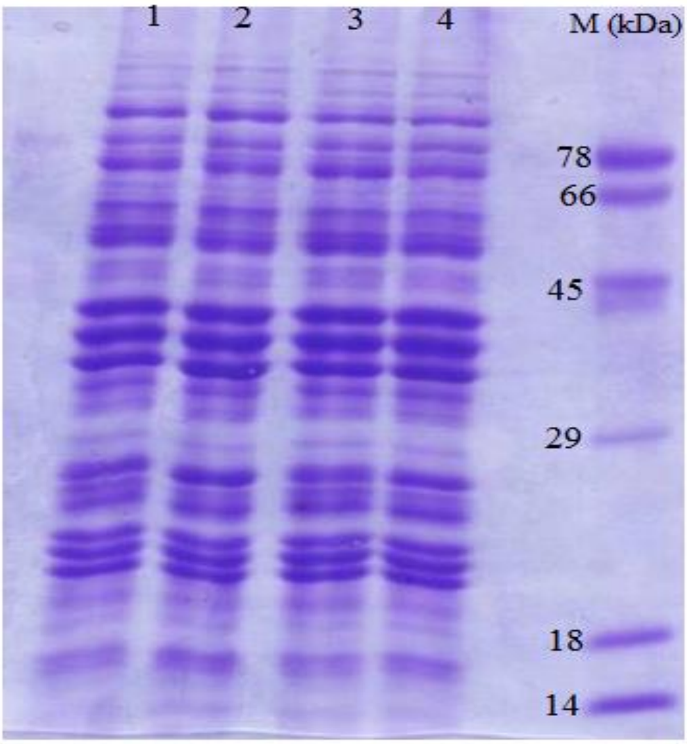
نتایج و بحث

اگرچه بسیاری از باندها در بسیاری از ارقام وجود داشتند و لیکن میزان تراکم پروتئین بعضی باندها در برخی ارقام متفاوت بود. بر اساس نتایج، به‌طور میانگین ارقام دارای حداقل ۲۸/۷۵باند (شامل باند ضعیف و قوی) بودند. رقم هاشم در محدوده ۲۵کیلودالتونی دارای یک باند ضعیف نسبت به سایر ارقام در این محدوده بود و سایر ارقام، این باند پروتئینی را با شدت بیشتری داشتند. در محدوده ۱۷کیلودالتونی، ارقام آرمان و ILC-482 دارای باند پروتئینی ضعیفی نسبت به سایر ارقام در همین محدوده بودند که به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها در مطالعات الکتروفورز دوبُعدی مشهودتر باشد. در مطالعه‌ای Hameed *et al*, (2009) محدوده وزن مولکولی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ژنوتیپ‌های نخود کابلی را در ژل SDS-PAGE بین ۲۵ تا ۱۰۸کیلودالتون بررسی و تعداد باندها را ۲۰ تا ۲۲باند گزارش کردند. در مطالعه‌ای Iqbal *et al*, (2005) پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر واریته‌های نخود با تکنیک الکتروفورز تک‌بعدی ۱۲باند پروتئینی را با محدوده وزن مولکولی ۲۴ تا ۶۶کیلودالتون گزارش کردند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که در الگوی پروتئینی تفاوت چشمگیری قابل مشاهده نیست و تفاوت در باندها بسیار جزئی می‌باشد.

---

[1] TOL: Tolerance
[2] SSI: Stress Susceptibility Index
[3] SI: Stress Intensity
[4] HAM: Harmonic Mean
[5] YI: Yield Index
[6] GMP: Geometric Mean Productivity
[7] YSI: Yield Stability Index
[8] STI: Stress Tolerance Index
[9] MP: Mean Productivity
[10] Jaccard Coefficient

پیشنهاد مؤلفان بر این است که پروتئین‌های بذر و قسمت‌های رویشی در مراحل رشدی مختلف با الکتروفورز در دو بعد همراه با ژنوتیپ‌های بیشتری جهت بررسی تنوع و برنامه‌های به‌نژادی مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفته و برای نتایج بهتر و با تنوع بیشتر، از نشانگرهای DNA نیز استفاده و نتایج با یکدیگر مورد ارزیابی قرار گیرند. نتایج این مطالعه بیشتر تفاوت در تعداد باندها را نشان می‌دهد. پروتئین‌های ذخیره‌ای ضمن داشتن چندشکلی زیاد، بسیار باثبات هستند، بنابراین الگوی الکتروفورزی پروتئین ذخیره بذر به تنهایی یا با سایر نشانگرها معیار مطلوبی جهت شناسایی جمعیت‌های گیاهی خواهد بود (Lawerence*et al*., 1987). در تحقیقی نیز Mukhlesur & Hirata, (2004) فاصله ژنتیکی گونه‌های مختلف کلزا را بر اساس الگوی باندی SDS-PAGE بذر و برگ، مطالعه و تنوع باندی بین آن‌ها را گزارش کردند. بر اساس نتایج این تحقیق، ۱۶باند متفاوت روی صفحه ژل آکریل آمید ظاهر شد. الگوی نواری پروتئین‌ها در برخی گروه‌های مشابه و در برخی دیگر کاملاً متفاوت بودند (شکل ۱). رقم ILC-482 و آرمان و هاشم به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد باند را داشتند و بیشترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ILC-482 و آرمان بود (شکل۲). در رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو دامنه ضرایب تشابه از ۰/۷۸ تا ۰/۸۷ متغیر بود (جدول ۱). در شرایط تنش خشکی بیشترین تشابه بین ارقام آزاد و ILC-482 (۰/۳) و در شرایط شرایط آبیاری تکمیلی بین ارقام آزاد و هاشم (۰/۵۵) مشاهده گردید (جداول ۲ و ۳). جهت تعیین همبستگی بین صفات زراعی و مولکولی از آزمون مانتل-هانزل (Mantel-Haenszel) استفاده گردید که همبستگی معنی‌داری بین صفات زراعی در شرایط تنش خشکی و شرایط آبیاری تکمیلی با داده‌های مولکولی در سطح احتمال ۵درصد نشان داد. به عبارتی تنوع موجود در سطح مزرعه تنوع موجود در سطح داده‌های مولکولی را تأیید کرد. نتایج موجود در این مطالعه با نتایج Kakaei*et al*, (2009) در ژنوتیپ‌های کلزا همخوانی داشت.



شکل ۱- الگوی نواری پروتئین‌های بذر نخود با استفاده از SDS-PAGE

(۱) رقم ILC-482، (۲) آزاد، (۳) رقم آرمان و (۴) رقم هاشم

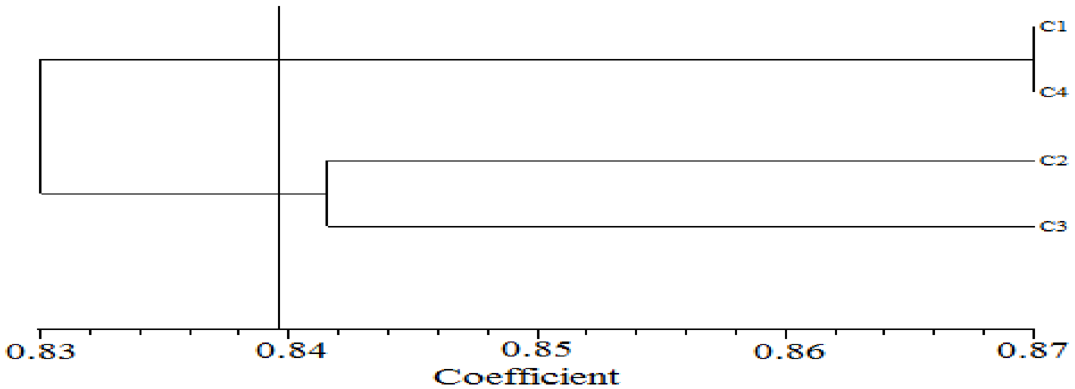
Fig. 1. Chickpea protein banding patterns using SDS-PAGE

(1) ILC-482, (2) Azad, (3) Arman, (4) Hashem

جدول ۱- ضریب تشابه جاکارد بر اساس ویژگی‌های الکتروفورزی پروتئین بذر در چهار رقم نخود

Table 1. Jaccard's similarity matrix based on protein marker (Molecular Data)

	ILC-482	Azad	Arman	Hashem
ILC-482	1			
Azad	0.8	1		
Arman	0.78	0.83	1	
Hashem	0.87	0.87	0.84	1



شکل۲- دندروگرام حاصل از تحلیل داده‌های الکتروفورزی بر اساس باندهای پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه ارقام نخود با روش UPGMA

(۱) رقم ILC-482، (۲) آزاد، (۳) رقم آرمان و (۴) رقم هاشم

Fig. 2. Dendrogram for *Cicer aretinum* cultivars based on SDS-PAGE markers via UPGMA method

(1) ILC-482, (2) Azad, (3) Arman, (4) Hashem

جدول ۲- ماتریس تشابه جاکارد بر اساس داده‌های زراعی ارقام نخود در شرایط تنش خشکی

Table 2. Jaccard's similarity matrix of chickpea cultivars based on agronomy data in drought stress condition

	ILC-482	Azad	Arman	Hashem
ILC-482	1			
Azad	0.30	1		
Arman	0.0	0.20	1	
Hashem	0.143	1	0.166	1

جدول ۳- ماتریس تشابه جاکارد بر اساس داده‌های زراعی ارقام نخود در شرایط آبیاری تکمیلی

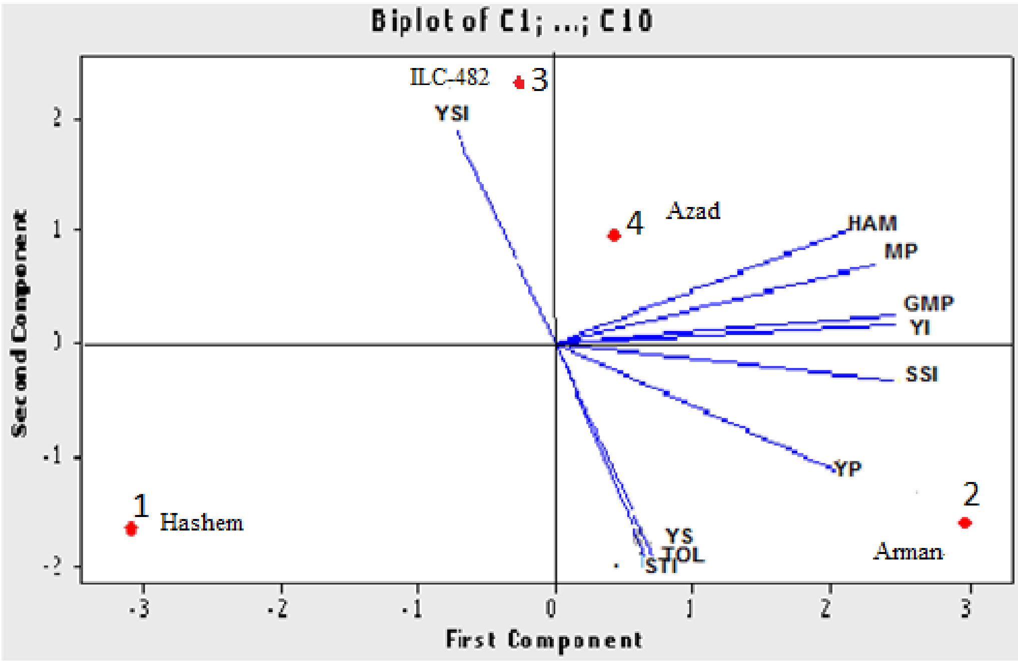
Table 3. Jaccard's similarity matrix of chickpea cultivars based on agronomy data in supplementary irrigation

	ILC-482	Azad	Arman	Hashem
ILC-482	1			
Azad	0.166	1		
Arman	0.0	0.25	1	
Hashem	0.2	0.55	0.143	1

بای‌پلات شاخص‌های تحمل به خشکی

در بررسی بای‌پلات شاخص‌های تحمل به خشکی، ارقام نسبت به هم تنوع و فاصله دارند و ارقام آرمان و آزاد نسبت به دو رقم هاشم و ILC-482 تقریباً مجاور شاخص‌های تحمل به خشکی قرار دارند (شکل ۳)که نشان از حفظ عملکرد آن‌ها در شرایط تنش خشکی است. جدول ۴، مقادیر ویژه، سهم تجمعی و بردارهای ویژه شاخص‌های تحمل به خشکی و عملکرد در دو شرایط محیطی را نشان می‌دهد. رقم آرمان در ناحیه چهارم قرار دارد که دارای مقدار بالای مؤلفه اول و مقدار کم مؤلفه دوم می‌باشد که این خصوصیت در جدول۴ نیز مشهود است. رقم آزاد در ناحیه یک بای‌پلات قرار دارد که دارای میزان بالای مؤلفه اول و دوم می‌باشد که به‌عنوان مثال در مورد شاخص HAM در جدول۴، بر اساس هر دو مؤلفه میزان بالایی را به خود اختصاص داده است. در خصوص رقم ILC-482 که در

ناحیه دوم بای‌پلات قرار گرفته است، دارای میزان بالای مؤلفه دوم (۰/۴۹۰) و میزان کم مؤلفه اول (۰/۱۱۵-) می‌باشد که در جدول۴ نیز مشهود است. از نمودار چندمتغیره بای‌پلات که امکان مطالعه رابطه بیش از سه متغیر را به صورت همزمان فراهم می‌آورد نیز به منظور گزینش دقیق‌تر ژنوتیپ‌ها استفاده گردید. در مطالعه شاخص‌های خشکی استفاده از بای‌پلات توسط محققان بسیاری گزارش گردیده است (Abolhassani & Saeidi, 2006; Farshadfar & Shutka, 2003) که نشان‌دهنده اهمیت مطالعه شاخص‌های تحمل خشکی می‌باشد.



شکل ۳- نمایش بای‌پلات شاخص‌های مورد مطالعه در ارقام نخود براساس مؤلفه‌های اصلی اول و دوم

Fig. 3. View Biplot indices in chickpea cultivars based on main elements of the first and second
(HAM: Harmonic Mean; YI: Yield Index; GMP: Geometric Mean Productivity; YSI: Yield Stability Index; STI: Stress Tolerance Index; TOL: Tolerance; YS: Yield Stress; YP: Yield Potential; SSI: Stress Susceptibility Index; MP: Mean productivity)

جدول ۴- مقادیر ویژه، سهم تجمعی و بردارهای ویژه شاخص‌های تحمل به خشکی و عملکرد در دو شرایط محیطی

Table 4. Eigen values and eigenvectors cumulative share index of drought tolerance and yield in both conditions

مؤلفه Component	مقادیر ویژه Eigen values	سهم تجمعی Eigenvectors cumulative	SSI	MP	HAM	YI	STI	YSI	GMP	TOL	YS	YP
1	61.709	0.617	0.115	0.397	0.375	0.344	0.401	-0.115	0.399	0.106	0.344	0.328
2	38.274	0.383	-0.490	-0.088	0.184	0.265	0.046	0.490	0.068	-0.493	0.265	-0.297
3	0.0017	0	-0.156	0.305	-0.691	0.261	0.145	0.156	-0.390	0.085	0.261	0.254

(HAM: Harmonic Mean; YI: Yield Index; GMP: Geometric Mean Productivity; YSI: Yield Stability Index; STI: Stress Tolerance Index; TOL: Tolerance; YS: Yield Stress; YP: Yield Potential; SSI: Stress Susceptibility Index; MP: Mean productivity)

همبستگی شاخص‌های تحمل به خشکی

جدول۵ همبستگی شاخص‌های تحمل به خشکی را با یکدیگر نشان می‌دهد. شاخص‌های YI و HAM همبستگی مثبت (به ترتیب ۱ و ۰/۹۸۴) با عملکرد در شرایط تنش دارند، همچنین شاخص HAM همبستگی مثبت با عملکرد در شرایط تنش خشکی دارد (۰/۹۸۴). شاخص SSI همبستگی مثبت با TOL و همبستگی منفی با YSI داشته و MP نیز همبستگی مثبتی باGMP وSTI دارد. محققان وضعیت نسبی عملکرد ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش و شرایط آبیاری تکمیلی را به‌عنوان معیارهای مناسب برای تحمل به خشکی پیشنهاد نموده‌اند (Blum, 1988; Ganjeali *et al*., 2008). با توجه به این که شاخص‌های YI و HAM همبستگی مثبت و بسیاربالایی با عملکرد در شرایط تنش نشان دادند، می‌توان از این شاخص‌ها به‌عنوان معیارهای مناسب برای گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی بهره گرفت (Blum, 1988; Elshazly & Warboys, 1989).

جدول ۵- ضرایب همبستگی شاخص‌های تحمل به خشکی

Table 5. Correlation coefficient drought stress tolerance index

	YP	YS	TOL	GMP	YSI	STI	YI	HAM	MP	SSI
YP	1									
YS	0.394	1								
TOL	0.775	-0.275	1							
GMP	0.730	0.916	0.134	1						
YSI	-0.790	0.252	-1**	-0.157	1					
STI	0.758	0.898	0.175	0.999*	-0.199	1				
YI	0.394	1**	-0.275	0.916	0.252	0.898	1			
HAM	0.549	0.984*	-0.102	0.972*	0.078	0.961*	-0.984*	1		
MP	0.902	0.753	0.425	0.953*	-0.447	0.966*	0.753	0.856	1	
SSI	0.790	-0.252	1**	0.157	-1**	0.199	-0.252	-0.078	0.447	1

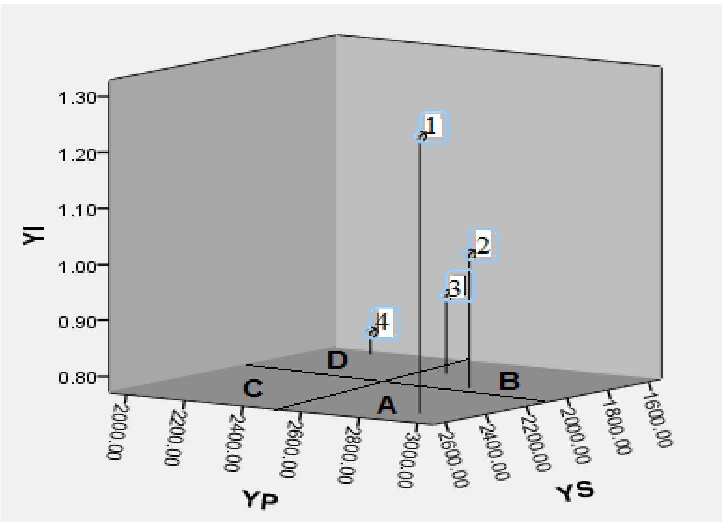
*، **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵درصد و ۱درصد

*, **: Significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively

(HAM: Harmonic Mean; YI: Yield Index; GMP: Geometric Mean Productivity; YSI: Yield Stability Index; STI: Stress Tolerance Index; TOL: Tolerance; YS: Yield Stress; YP: Yield Potential; SSI: Stress Susceptibility Index; MP: Mean productivity)

گزینش بهترین ژنوتیپ‌های تحمل به خشکی

نمودار پراکنش سه‌بعدی، رابطه بین سه متغیر عملکرد در شرایط تنش (Ys) و بدون تنش (Yp) و نیز شاخص‌های تحمل به خشکی را بیان می‌نماید (شکل۴). برای گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی با عملکرد بالا در هر دو محیط از نمودار سه بعدی استفاده گردید که در آن عملکرد در محیط تنش روی محور Xها، عملکرد در محیط شرایط آبیاری تکمیلی روی محور Yها و یکی از شاخص‌های انتخاب‌شده روی محور Zها نمایش داده شد. برای نشان‌دادن روابط بین این سه متغیر و جدانمودن ژنوتیپ‌های گروهA از گروه‌های دیگر (B، C و D) و همچنین تشخیص سودمندی شاخص مورد نظر به‌عنوان معیاری برای انتخاب ژنوتیپ‌های پرمحصول و متحمل خشکی، سطح X-Y به وسیله کشیدن خطوط متقاطع به چهار گروهA، B، C و D تقسیم گردید. بر اساس شاخص عملکرد (YI) رقم آرمان در گروهA نمودار قرار گرفت و از نظر شاخص‌های تحمل و پاسخ به خشکی برتر از سایرین بود. همچنین تحت هر دو شرایط تنش و بدون تنش خشکی عملکرد بالایی تولید کرده است که به‌عنوان ژنوتیپ کاندیدا برای تحمل به خشکی پیشنهاد می‌شود (نمودار سه‌بعدی بر اساس شاخصYI ذکر شده‌اند). استفاده از نمودار پراکنش سه‌بعدی برای گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در مطالعات مختلف، تأیید شده است از جمله در کلزا (Kakaei*et al*., 2009) و نخود (Farshadfar & Farshadfar, 2003).



شکل۴- گزینش ژنوتیپ‌ها بر اساس مدل فرناندز توسط شاخص YI

۱- آرمان، ۲-آزاد، ۳- ILC-482 و ۴-هاشم

Fig. 4. Selection of genotypes based on Fernandez method the index YI

1- Arman, 2- Azad, 3- ILC-482 and 4- Hashem

همبستگی صفات در شرایط تنش خشکی

جدول۶، همبستگی صفات در شرایط تنش خشکی را نمایش می‌دهد. همان‌طورکه از جدول مذکور نمایان است، صفت عرض کانوپی همبستگی منفی (۰/۹۹۶-) و نسبتاً بالایی با صفت تعداد شاخه فرعی دارد. همچنین صفت عرض کانوپی دارای همبستگی منفی (۰/۹۶۳-) با صفت عرض نیام می‌باشد. صفت درصد پوکی نیام با عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی دارای همبستگی مثبت (۰/۹۷۳+) نسبتاً بالایی است؛ به عبارت دیگر در شرایط خشک، درصد پوکی نیام‌ها زیاد است و گرده افشانی ضعیفی صورت گرفته است. صفت تعداد نیام دوبذری با صفت وزن۱۰۰دانه دارای همبستگی منفی زیادی است (۰/۹۵۱-) که بیان می‌کند هرچه نیام‌ها دارای دانه بیشتری باشند، به دنبال آن، وزن هر کدام از دانه‌ها کاهش می‌یابد. صفت روز تا نیام‌دهی کامل دارای همبستگی منفی نسبتاً بالایی با صفت تعداد نیام در بوته می‌باشد (۰/۹۶۵-) که در شرایط تنش خشکی گیاه رشد زایشی را جلوتر انداخته و سعی در تولید دانه (هر چند با عملکرد کمتر) و نهایتاً حفظ بقاء را دارد. بین سایر صفات همبستگی مشاهده نگردید.

همبستگی صفات در شرایط بدون تنش (اعمال آبیاری تکمیلی)

صفت عرض نیام همبستگی مثبت و بالایی (۰/۹۵۱) با صفت ارتفاع بوته داشت (جدول ۷)، چرا که هر چه ارتفاع بیشتر باشد، بوته و نهایتاً نیام فرصت بزرگ‌ترشدن را پیدا می کند. همچنین صفت وزن۱۰۰دانه همبستگی مثبت و بالایی (۰/۹۹۴) با عملکرد دانه در شرایط کنترل داشت، زیرا وزن۱۰۰دانه یکی از اجزای اصلی عملکرد دانه است. صفت روز تا نیام‌دهی کامل با صفت درصد پوکی نیام همبستگی همسو و مثبتی (۰/۹۶۹) داشتند. احتمالاً افزایش روز تا نیام‌دهی کامل باعث تغییرات در ژنتیک نیام شده و باعث عدم شکل‌گیری دانه در نیام و نهایتاً پوکی آن‌ها شده است. پس احتمالاً هر چقدر روز تا نیام‌دهی کامل بیشتر باشد، گیاه به علت افزایش تعداد نیام قادر به پرکردن همه نیام‌ها نخواهد بود. بین سایر صفات همبستگی خاصی ملاحظه نگردید.

جدول۶- ضریب همبستگی ساده بین صفات زراعی مورد مطالعه در ارقام نخود در شرایط تنش خشکی

Table 6. Correlation coefficient between agronomy traits in *Cicer aretinum* cultivars under study in drought stress condition

		Pod width عرض نیام	Pod length طول نیام	Width canopy عرض کانوپی	100 Seed weight وزن۱۰۰دانه	Percent of pod null درصد پوکی نیام	Number of 2seed pod تعداد نیام دوبذری
عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی	Seed yield in drought stress condition						
تعداد شاخه فرعی	Number of sub branch						
تعداد نیام در گیاه	Number of pod in plant						
ارتفاع گیاه	Plant height						
تعداد گیاه در مترمربع	Number of plant.m^{-2}						
عرض نیام	Pod width	1					
طول نیام	Pod length	0.441	1				
عرض کانوپی	Width canopy	-0.963*	0.236	1			
وزن۱۰۰دانه	100 Seed weight	-0.405	-0.943	-0.266	1		
درصد پوکی نیام	Percent of pod null	0.233	-0.013	0.089	0.336	1	
تعداد نیام دوبذری	Number of 2seed pod	0.104	0.865	-0.025	-0.951*	-0.474	1
روز تا نیام‌دهی کامل	Day to complete podding	0.441	-0.143	0.641	-0.130	-0.634	0.024

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵درصد و ۱درصد

* & **: Significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

ادامه جدول۶- ضریب همبستگی ساده بین صفات زراعی مورد مطالعه در ارقام نخود در شرایط تنش خشکی

Continue the Table 6. Correlation coefficient between agronomy traits in *Cicer aretinum* cultivars under study in drought stress condition

		Seed yield in drought stress condition عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی	**Number of sub branch** تعداد شاخه فرعی	**Number of pod in plant** تعداد نیام در گیاه	**Plant height** ارتفاع گیاه
عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی	Seed yield in drought stress condition	1			
تعداد شاخه فرعی	Number of sub branch	-0.189	1		
تعداد نیام در گیاه	Number of pod in plant	0.424	0.678	1	
ارتفاع گیاه	Plant height	0.609	-0.875	-0.421	1
تعداد گیاه در مترمربع	Number of plant.m^{-2}	-0.154	-0.689	-0.945	0.587
عرض نیام	Pod width	0.438	-0.943	-0.395	0.910
طول نیام	Pod length	0.159	-0.228	0.370	0.086
عرض کانوپی	Width canopy	0.278	-0.996**	-0.625	0.913
وزن۱۰۰دانه	100 Seed weight	0.155	0.289	-0.126	0.004
درصد پوکی نیام	Percent of pod null	-0.973*	0.002	0.495	0.469
تعداد نیام دوبذری	Number of 2seed pod	-0.344	-0.009	0.240	-0.313
روز تا نیام‌دهی کامل	Day to complete podding	-0.524	-0.705	-0.965*	0.355

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵درصد و ۱درصد

* & **: Significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

جدول ۷- ضریب همبستگی ساده بین صفات زراعی مورد مطالعه در ارقام نخود در شرایط کنترل (اعمال آبیاری تکمیلی)

Table 7. Correlation coefficient between agronomy traits in *Cicer aretinum* cultivars under study in control condition

		Pod width عرض نیام	**Pod length** طول نیام	**Width canopy** عرض کانوپی	**100 Seed weight** وزن۱۰۰دانه	**Percent of pod null** درصد پوکی نیام	**Number of 2seed pod** تعداد نیام دو بذری
عملکرد دانه در شرایط آبیاری تکمیلی	Seed Yield in supplementary irrigationcondition						
تعداد شاخه فرعی	Number of sub branch						
تعداد نیام در گیاه	Number of pod in plant						
ارتفاع گیاه	Height plant						
تعداد گیاه در مترمربع	Number of plant						
عرض نیام	Pod width	1					
طول نیام	Pod length	0.637	1				
عرض کانوپی	Width canopy	0.771	0.073	1			
وزن صد دانه	Hundred seed weight	-0.840	-0.664	-0.729	1		
درصد پوکی نیام	Percent of pod null	-0.145	-0.709	0.127	0.556	1	
تعداد نیام دوبذری	Number of 2seed pod	0.732	0.280	0.483	-0.247	0.458	1
روز تا نیام‌دهی کامل	Day to complete poding	-0.385	-0.831	-0.060	0.721	0.696**	0.235

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵درصد و ۱درصد

* & **: Significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

ادامه جدول ۷- ضریب همبستگی ساده بین صفات زراعی مورد مطالعه در ارقام نخود در شرایط کنترل (اعمال آبیاری تکمیلی)

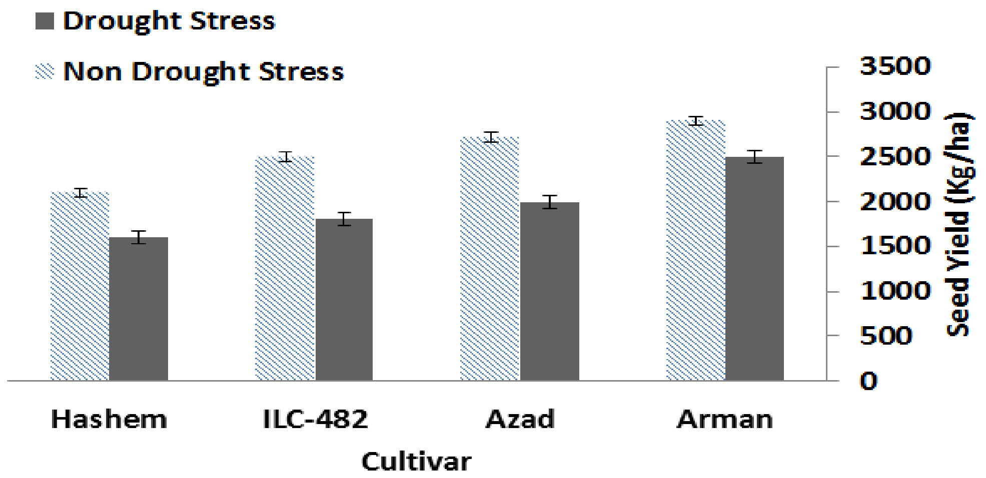
Continue the Table 7. Correlation coefficient between agronomy traits in *Cicer aretinum* cultivars under study in control condition

		Seed yield in supplementary irrigation condition عملکرد دانه در شرایط آبیاری تکمیلی	Number of sub branch تعداد شاخه فرعی	Number of pod in plant تعداد نیام در گیاه	Plant height ارتفاع گیاه	Number of plant.m^{-2} تعداد گیاه در مترمربع	Pod width عرض نیام
عملکرد دانه در شرایط آبیاری تکمیلی	Seed yield in supplementary irrigation condition	1					
تعداد شاخه فرعی	Number of sub branch	-0.155	1				
تعداد نیام در گیاه	Number of pod in plant	0.675	0.789	1			
ارتفاع گیاه	Plant height	-0.846	0.378	-0.625	1		
تعداد گیاه در مترمربع	Number of plant	0.008	-0.127	0.345	0.428	1	
عرض نیام	Pod width	-0.895	0.533	-0.830	0.951*	0.140	1
طول نیام	Pod length	-0.676	-0.154	-0.100	0.831	0.712	0.637
عرض کانوپی	Width canopy	-0.758	0.574	-0.948	0.539	-0.522	0.771
وزن۱۰۰دانه	100 Seed weight	0.994**	-0.056	0.615	-0.794	0.043	-0.840
درصد پوکی نیام	Percent of pod null	0.487	0.757	-0.313	-0.310	-0.333	-0.145
تعداد نیام دوبذری	Number of 2seed pod	0.352	0.897	-0.731	0.692	0.271	0.732
روز تا نیام‌دهی کامل	Day to complete podding	0.671	0.570	-0.093	-0.533	-0.368	-0.385

* و **: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵درصد و ۱درصد

* & **: Significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

بیشترین عملکرد در شرایط تنش خشکی و شرایط آبیاری تکمیلی مربوط به رقم آرمان می‌باشد که مکمل نتایج حاصل از نمودار سه بعدی و تجزیه بای‌پلات می‌باشد (شکل۵).



شکل ۵- عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی و بدون تنش خشکی (آبیاری تکمیلی)

Fig. 5. Seed yield in drought and non-drought stress (supplementary irrigation) condition

به‌طورکلی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر که منبع غذایی ارزشمندی برای انسان‌ها محسوب می‌شوند، در طول رویش بذر، تغییر ماهیت داده و منجر به تولید اسیدهای آمینه می‌شوند که منبع غذایی جنین در حال نمو است. پروفایل‌های پروتئین ذخیره‌ای بذر از جمله ابزارهای تعیین نزدیکی ژنتیکی در سطح مولکولی و حل مشکلات تاکسونومیکی و تبارشناختی است. از این اطلاعات تاکنون جهت تفکیک ارقام زراعی، حصول اطمینان از تشخیص صحیح گونه و تنوع‌ژنتیکی گیاهان مختلف بهره گرفته شده است (Raeesilelri *et al.*, 2015). از باندهای اختصاصی پروتئین‌های بذر احتمالاً بتوان برای شناسایی ژنوتیپ‌ها استفاده نمود. نتایج نشان داد که الکتروفورز (SDS-PAGE) پروتئین‌های بذر، می‌تواند به‌عنوان روشی ساده و اقتصادی جهت شناسایی تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم مورد استفاده قرار گیرد. به علت وجود تنوع ارقام در فضای بای‌پلات می‌توان عمل انتخاب را جهت برنامه‌های اصلاحی آتی از بین ارقام مورد مطالعه انجام داد. بر اساس سایر روش‌های آماری مولکولی و کمی در این مطالعه رقم آرمان با توجه به وجود بیشترین اختلاف با سایر ارقام (جدول تجزیه خوشه‌ای و جدول تشابه جاکارد) و بالابودن عملکرد در هر دو شرایط محیطی، رقمی مناسب برای کشت در منطقه تحقیق می‌باشد. در خصوص نتیجه‌گیری کلی بخش پروتئینی قابل ذکر است که الگوی پروتئینی بذرهای نخود بر اساس حضور و عدم حضور باندهای پروتئینی تنوع‌ژنتیکی را مشخص نموده و قادر است شناساگرهای پروتئینی خاصی را معرفی کند که در شناسایی ارقام مختلف مورد استفاده می‌باشد. پیشنهاد در خصوص مطالعه حاضر این است که آزمایش در سال‌های زراعی آینده در منطقه مورد مطالعه به لحاظ تغییرات شرایط آب‌وهوایی مجدداً با ژنوتیپ‌های بیشتری مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرد و نیز جهت بررسی تفاوت بین ارقام از نظر مولکولی، علاوه بر نشانگر پروتئینی (SDS-PAGE) از نشانگرهای DNA هم استفاده گردد.

سپاسگزاری

از دانشگاه پیام‌نور و مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به‌ویژه دکتر علی مصطفایی که به نحوی در انجام این گزارش همکاری نمودند، صمیمانه قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Ahmed, F., Gaur, P.M., and Slinkard, A.E. 1992. Isozyme polymorphism and phylogenetic interpretations in the genus *Cicer* L. as revealed by polyacryamid gel electrophoresis of seed stronge protein. Theoretical and Applied Genetics 84: 688-692.
2. Abd El-Zaher, M., and Mustafa, A. 2007. Genetic variation among Egyptian cultivars of *Vicia faba* L. Pakistan Journal of Biological Science 10(23): 4204-4210.
3. Abolhassani, K.H., and Saeidi, G.H. 2006. Evaluation of drought tolerance of safflower lines based on tolerance and sensitivity indices to water stress. Journal of Science and Technological Agricultural and Natural 10: 407-418 (in Persian).
4. Abozaryghazafroodi, A., Valizadeh, M., Honarneghad, R., and fotokeean, M.H. 2006. Comparison of clustering rice varieties the use SDS-PAGE Gel Electrophoresis Seed Proteins and Biometrical Traits data. Journal of Sciences Agricultural 36(5): 1251-1262.
5. Beyranvand, A., Karimzadeh, G., and Sorooshzadeh, A. 2006. Study of a vernalization temperature on quantitative and electrophoretic changes of leaf soluble proteins in winter and spring canola (*Brassica napus*) cultivars. Journal of Agricultural Science NatureResource 12(5): 182-189.
6. Blum, A. 1988. Plant Breeding for Stress Environment. CRC Press. Roca Raton, FL. pp: 38-78.
7. Bouslama, M., and Schapaugh, W.T. 1984. Stress tolerance in soybean. Part 1: evaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. Crop Science 24: 933-937.
8. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochmistry 72: 248-254.
9. Ehsanpor, A.A., Shojaie, B., and Rostami, F. 2009. The use of embryonic markers and seed storage proteins in identification of four pistachio cultivars. Journal Taxonomy and Biosystematics 2(3): 1-10. (In Persian).
10. Elshazly, M.S., and Warboys, I.B. 1989. The use of transparent flexible tubes for studying the root extension and elongation of beans. Journal of Experimental Agriculture 25: 35-37.
11. Razavizadeh, R., and Ehsanpour, A.A. 2013. Application of seed storage protein marker for identification of seven soybean (*Glycine max*) cultivars. Journal of Cell & Tissue (JCT) 3(4): 319-326.

12. Fareghi, S.H., Farshadfar, M., and Farshadfar, E. 2007. Study of chemical composition and nutrition value of prenniallucerne (*Medicago sativa* L.) and genetic diversity based on SDS-PAGE markes. Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 15(3): 196-210. (In Persian).
13. Farshadfar, A., and Farshadfar, M. 2003. Evaluation of the genetic diversity of physiological and molecular markers RAPD chickpea lines in irrigated and rainfed conditions. Research and Builders 2(2): 69-63. (In Persian).
14. Fernandez, G.C.J. 1992. Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. In: C.C. Kuo (Ed.). Proceeding of an International Symposium on Adaptation of Food Crops to Temperature and Water Stress. AVRDC, Shanhua, Taiwan.
15. Fischer, R.A., and Maurer, R. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. Australian Journal of Agricultural Research 29: 897-917.
16. Farshadfar, E., and Shutka, J. 2003. Multivariate analysis of drought tolerance in wheat substitution lines. Cereal Research Communications 31: 33-40.
17. Ganjeali, A., Bagheri, A.R., and Porsa, H. 2008. Germplasm evaluation chickpea (*Cicer arietinum* L.) for drought resistance. Iran Agricultural Research Magazine 7(1): 183-194. (In Persian).
18. Gupta, P.K., and Agrawal, G.G. 1977. Consumptive use of water by gram and linseed. India Journal Agriculture Science 47: 22-26.
19. Ghafoor, A., Ahmad, Z., Qureshi, A.S., and Bashir, M. 2002. Genetic relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V.radiata*(L.) R. Wilczek based on morphological traits and SDS-PAGE. Euphytica 123: 367-378.
20. Gepts, P. 1989. Genetic diversity of seed storage proteins in plants. In: A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, and B.S. Weir [Eds.]. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources 64-82. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
21. Hameed, A., Mahmud Shah, T., Manzooratta, B., Iqbal, N., AhsanulHaq, M., and Ali, H. 2009. Comparative seed storage protein profiling of Kabuli chickpea genotypes. Pakistan Journal Biotechnology 41(2): 703-710.
22. Iqbal, S.M., Ghafoor, A., and Ayub, N. 2005. Relationship between SDS-PAGE Markers and *Ascochyta Blight* in chickpea. Pakistan Journal Biological Science 37(1): 87-96.
23. Iran's Agricultural Statistics. 2017. http://amar.maj.ir/Portal/File/ShowFile.aspx.
24. Jinghui, X.X., Wang, L., Shanyu, x., Zhou, L., Yue, J.F., and Dongyun, H. 2006. Polyethylene glycol fraction improved detection of low-abundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of plant proteome. Phytochemistry 67: 2341-2348.
25. Kakaei, M., Zebarjadi, A.R., and Mostafaie, A. 2009. Comparison of genetic and morpho-physiological distance via SDS-PAGE marker in some Rapeseed genotypes. Journal of Agricultural Biotechnology 1(2): 1-15. (In Persian).
26. Kakaei, M., Zebarjadi, A.R., Mostafaie, A., and Rezaiezad, A. 2009. Determination of drought tolerant genotypes in *Brassica napus* L. based on drought tolerance indices. Journal of Electronic Plant Production 3(4): 107-124. (In Persian).
27. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
28. Lawerence, G.J., Moos, H.J., Shepherd, K.W., and Wrigley, C.W. 1987. Dough quality of biotypes of eleven Australian wheat cultivars that differ in HMW glutenin subunits composition. Journal Cereal Science 6: 99-101.
29. Mohammadi, A., Ahmadi, J., and Habibi, D. 2005. Selection indices for drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum*). Iranian Journal of Agronomy and Plant Breeding 1: 47-62. (In Persian).
30. Mukhlesur, R.M.D., and Hirata, Y. 2004. Genetic diversity in *Brassica* species using SDS-PAGE Analysis. Journal of Biological 4(2): 234-238.
31. Raeesilelri, F., Keshavarzi, M., and Ghadam, P. 2015. Prosopis species of dark bean seed proteins investigated in Iran. Journal of Applied Biology, University of Al-Zahra 28 (1): 79-88. (In Persian).
32. Rosielle, A.A., and Hamblin, J. 1981. Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environments. Crop Science 21: 943-946.
33. Sadia, M., Malik, S.A., Rabbani, M.A., and Pearce, S.R. 2009. Electrophoresis characterization and the relationship between some *Brassica* species. Electronically of Journal Biology 5(1): 1-4.
34. SalehiShanjani, P., Jafari, A.A., Kolagari, M., and Esmaeili, M. 2013. Genetic diversity and geographic relationship between the 18 wild populations of Agropyrondesertorum by proteins. Plant Journal (Journal of Biology Iran) 27(2): 243-255. (In Persian).

35. Shobeiri, S., Ghassemi-Golezani, K., Golechin, A. and Saba, J. 2007. Effect of water limitation on growth and yield of three chickpea cultivars in Zanjan. Journal of Agricultural Science and Natural Resources 14: 32-43.

36. Sneath P.H.A., and Sokal, R.R. 1973. Numerical Taxonomy. W.H: Freeman and CO, Sanfrancisco, U.S.A.

37. Valizadeh, M., Shareati, F., Alyari, H., and Moharamneghad, S. 2011. Evaluation of relationship some of in main economical traits with storage protein in *Phaseolus vulgaris* L. Iran Agricultural Research Magazine 43(1): 163-173. (In Persian).

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 10, No. 1, 2019, p. 12-27 (Research Article)

Study of relationship among seed proteins pattern with quantitative traits in some of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars

Kakaei*, M.[1]

Assistants Professor, Department of Agriculture (Plant Breeding and Genetics), Faculty of Sciences, Payame Noor University

Received: 15 July 2016
Accepted: 7 May 2017

DOI: 10.22067/ijpr.v10i1.57457

Introduction

Abiotic stress limits crop productivity, and plays a major role in determining the distribution of plant species across different types of environments. Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is an important legume crop in Iran. Genetic diversity information is crucial for the choice of proper parents to establish new breeding programs. A number of molecular techniques have been developed to unveil the genetic potentials of plant materials. One of the most important methods for studying genetic diversity is using of Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of seed protein.SDS-PAGE seems to be a reliable molecular marker to investigate the genetic diversity of chickpea genotypes in IRAN. SDS-PAGE is practically a reliable method because seed storage proteins are largely independent of environmental fluctuation. The main objectives of present research was: (1) to investigate the power of SDS-PAGE markers for estimation of genetic diversity among some chickpea genotypes in west of Iran, (2) to investigate the genetic relationships between chickpea genotypes and (3) to determine and studying main drought indexes in chickpea genotypes could be selected main cultivars in drought and non-drought condition. This information will be useful to improve techniques for sampling chickpea genetic variation which might increase efficiency of conservation of germplasm.

Materials & Methods

Field experiment was carried out with four chickpea cultivars, based on randomized complete blocks design (RCBD) with three replications at the research farm of the Payame Noor University center of Asadabad in two different conditions (Drought conditions and supplementary irrigation) during 2010 cropping season. The cultivars were taken from Dryland Agricultural Research Institute, Sararood. In this study, seed protein profile of four chickpea cultivars include Arman, Hashem, Azad and ILC-482, were analyzed by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE using 12/5% polyacrylamide). Protein extraction and gel electrophoresis was done By Laemmle (1970) Method. The seeds were powdered separately by liquid nitrogen. Cultivars seed protein were extracted by extraction buffer. At end of electrophoresis, protein bands were revealed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining. Biplot, 3D Plot, coefficient jaccard, cluster analysis and other analyses were done using the statistical software MSTAT-C, NTSYS and SPSS. The data for each cultivar was collected on a plot basis.

Results & Discussion

SDS-PAGE analysis showed significant differences between four cultivars chickpea at 17 and 25 kilo Dalton (kDa) bands. There are strong and weak proteins bands differences between cultivars. On the basis of SDS-PAGE results, 28.75 protein bands were observed with the Molecular Weight (MW) of 14 to 100 kDa. The presence of protein bands about 17 (kDa) in protein pattern of ILC-482, Hashem and Azad Cultivars and the absence of protein bands with approximate molecular weight 14 (kDa) in protein pattern of Arman cultivar can be used as protein markers for these chickpea cultivars. The specific proteins bands of seed may be used as markers for identification of the genotypes. Correlation between agronomic and molecular traits was assessed using Mantel test and significant positive correlation was observed between them. The results of drought stress indices and Biplot analysis suggested Arman genotype was the most tolerant. Biplot analysis also showed HAM and YI selection indices were the best to identify drought tolerant genotypes.

***Corresponding Author:** P.O.Box: 19395-4697, mehdikakaei37@gmail.com

Conclusion

In most cases, an intermediate level of polymorphism have been reported with SDS-PAGE markers, and this study showed a considerable amount of polymorphism. We recommend further studies to be conducted by using number of chickpea genotypes as well as bigger and DNA molecular markers. Results of this study can be used in germplasm management practices, developing plant geneticist and breeders for planning future explorations, and crop improvement purposes.

Keywords: Biplot, Jaccard coefficient, Mantel test, Protein Marker, Supplementary irrigation